

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/381344

09/381344



09/381344

27 APR 1998

WIPO PCT

Bescheinigung

PRIORITY DOCUMENT

Die Hoechst Aktiengesellschaft in Frankfurt am Main/  
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeich-  
nung

"Verlängerung der Expression von transgenen  
Proteinen durch immunmodulierende Behandlung"

am 21. März 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-  
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol  
A 61 K 31/44 der Internationalen Patentklassifikation erhal-  
ten.

München, den 20. Januar 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Zeichen: 197 11 800.3

Stück

## Beschreibung

Verlängerung der Expression von transgenen Proteinen durch immunmodulierende Behandlung

Die Erfindung betrifft die Verwendung eines oder mehrerer Immunsuppressiva zur Herstellung eines Arzneimittels, um die Toleranz eines Säugtiers gegenüber transgenen Zellen zu erhöhen, sowie ein Verfahren zum Identifizieren hierfür geeigneter Immunsuppressiva. Durch den Einsatz derartiger Arzneimittel wird die Produktion des transgenen Expressionsproduktes auch nach Absetzen der immunsuppressiven Behandlung deutlich verlängert.

Es ist bekannt, daß die Einschleusung von genetischem Material in Zellen eines Säugtiers, z. B. eines Menschen oder auch diverser Tiere wie Pferde, Schafe, Kühe, Ziegen, Schweine, Hunde, Mäuse oder Ratten, in vivo häufig eine immunologische Reaktion hervorruft. So werden die transgenen Zellen z. B. durch zytotoxische Immunzellen abgetötet und damit durch diese zelluläre Immunreaktion die über das eingeschleuste genetische Material bewirkte Expression eines oder mehrerer Proteine oder Peptide beendet. Eine humorale Immunreaktion wiederum erschwert oder verhindert die erneute Einschleusung des genetischen Materials, z. B. durch die Neutralisation der Vektoren mittels spezifischer Antikörper (Tripathy S. K. et al., nat. Med. 2(5), 1996, Seiten 545-550; Jang J. et al., Gene Ther. 3(2), 1996, Seiten 137-144).

Um eine unerwünschte Immunreaktion bei einer transgene Zellen erzeugenden Gentherapie zu unterdrücken oder zu verhindern, wurden daher immunsuppressiv wirkende Substanzen im Rahmen einer Begleittherapie eingesetzt. Als nachteilig erwiesen sich jedoch die z. T. damit verbundenen unangenehmen Nebenwirkungen sowie die erhöhte Infektanfälligkeit von immunsupprimierten Organismen, die einer längeren Gabe von Immunsuppressiva entgegenstehen (Lochmüller et al. Gene Ther. 3(8), 1996, Seiten 706-716).

In WO 96/12406 wurde beschrieben, daß durch eine immunsuppressive Begleittherapie die humorale Immunantwort gegen einen Adenovirus-Vektor unterdrückt werden kann und daß dadurch eine wiederholte Vektorgabe ermöglicht wird. Neben der Verwendung von Steroiden wie Dexamethason werden vor allem Cyclosporin A und 1-Amino-19-guanidin-11-hydroxy-4,9,12-triazanoridecan-10,13-dion-trihydrochlorid (Deoxyspergualin, im folgenden DSG genannt) für diesen Zweck empfohlen.

Aufgabe der Erfindung war die Identifizierung von Substanzen, die nachhaltig - also auch nach dem Absetzen der immunsuppressiven Begleittherapie - das rasche Zerstoren der transgenen Zellen verhindern und somit die Toleranz eines Säugtiers gegenüber transgenen Zellen erhöhen. Damit bleibt die Expression des oder der transgenen Produkte in vivo länger erhalten. Folglich könnte eine wiederholte Applikation des genetischen Materials unterbleiben oder zumindest von der Häufigkeit her eingeschränkt werden.

Es wurde gefunden, daß nur bestimmte Immunsuppressiva die gewünschte Wirksamkeit aufweisen. Nicht geeignet waren beispielsweise FK 506 und das in WO 96/12406 besonders empfohlene Cyclosporin A.

Die Aufgabe wird daher erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Identifizieren eines geeigneten Immunsuppressivums oder einer Kombination mehrerer Immunsuppressiva, die die Toleranz eines Säugtiers gegenüber transgenen Zellen erhöhen, sowie deren Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels oder einer Arzneimittelkombination zur Erhöhung der Toleranz eines Säugtiers, insbesondere des Menschen, gegenüber transgenen Zellen.

Von der Erfindung umfaßt wird die Verwendung eines Immunsuppressivums oder einer Kombination mehrerer Immunsuppressiva zur Herstellung eines Arzneimittels oder einer Arzneimittelkombination zur Erhöhung der Toleranz eines Säugtiers, insbesondere des Menschen, gegenüber transgenen Zellen. Hiermit ist gemeint, daß das oder die Immunsuppressiva in Form eines einzigen Arzneimittels verabreicht werden können oder in Form mehrerer Arzneimittel, die wiederum

jeweils ein oder mehrere Immunsuppressiva enthalten können.

Immunsuppressiva sind Substanzen, die in der Lage sind, immunologische

Reaktionen zu unterdrücken oder abzuschwächen. Sie werden vor allem in der

Transplantationsmedizin und zur Behandlung von Autoimmunerkrankheiten

verwendet. Geeignete Immunsuppressiva sind beispielsweise 5-Methyl-isoaxazol-4-carbonsäure-4-(trifluormethyl)-anilid (Leflunomid), DSG, Anti-T-Zell-Antikörper, Corticosteroide, Azathioprin, Cyclophosphamid oder Methrexat. Die chemische Struktur des Immunsuppressivums ist - vom allgemeinen Erfindungsgedanken gesehen - unerheblich, da das entscheidende Merkmal in seiner Wirkung begründet ist, die Toleranz gegenüber transgenen Zellen zu erhöhen.

Als Toleranz gegenüber transgenen Zellen wird verstanden, daß die transgenen Zellen nach Beendigung der erfindungsgemäßen immunsuppressiven Begleittherapie länger in der Lage sind, die transgenen Expressionsprodukte in vivo herzustellen als sie es in Säugtieren einer nicht immunsupremierten Kontrollgruppe vermögen.

Transgene Zellen sind Zellen jeglicher Art, also tierische, pflanzliche oder bakterielle Zellen, bevorzugt Zellen von Säugtieren, ganz besonders bevorzugt menschliche Zellen, in die genetisches Material eingeschleust worden ist.

Unerheblich ist für den allgemeinen Erfindungsgedanken das mit der Herstellung der transgenen Zellen verbundene Ziel, z.B. eine gentherapeutische Behandlung oder aber die Nutzung eines Tieres mit transgenen Zellen als Wirkstoffproduzent. Des weiteren ist auch weder das Herstellungsverfahren der transgenen Zellen noch das genetische Material *per se* für die Erfindung von ausschlaggebender Bedeutung. Das eingeschleuste genetische Material kann beispielsweise aus einer oder mehreren Desoxyribonukleinsäure- und/oder Ribonukleinsäureketten bestehen. Die Nukleinsäureketten können Promotoren, diverse andere gentechnologische Steuerungsfunktionen, Sequenzen für einen spezifischen Einbau ins zelluläre Genom und/oder Gensequenzen enthalten, die für spezifische Proteine oder Peptide kodieren. Das eingeschleuste genetische Material kann gegenüber dem

zellulären Genom artfremd oder artgleich sein oder sogar vom selben Individuum abstammen. Auch eine Kombination derselben ist möglich. Das oder die spezifischen transgenen Expressionsprodukte können nicht-natürliche oder natürliche, z.B. menschliche, tierische, pflanzliche, bakterielle oder virale, Proteine oder Peptide darstellen. Beispiele sind Enzyme, Rezeptoren, Botenstoffe, Hormone, Wachstumsfaktoren, Gerinnungsfaktoren, Apoptoproteine, den Stoffwechsel oder die Zellteilung beeinflussende Faktoren, entzündungshemmende Faktoren, Inhibitoren oder Aktivatoren des Zellzyklus sowie intrazellulärer Signalketten, Tumorsuppressoren, Elemente des Zytoskeletts oder des Bindegewebes, Antigene von Krankheitserregern oder Parasiten sowie tumor-assoziierte Antigene. Weitere Beispiele sind Insulin, Hirudin, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor XIII, von Willebrand-Faktor, Antikörper, Erythropoitin, menschliches Wachstums-hormon, "Growth factors" wie EGF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , GM-CSF, PDGF, Nerve growth factor u.a.; "Tumor necrosis factor"; Interferone; Interleukine; p53; Tumorthherapie; Hepatitis-Virus-Antigene; HIV-Antigene, Herpes-Virus-Antigene; Borrelia-Antigene; Plasmodium-Antigene; Trypanosomen-Antigene, Taenia-Antigene oder Humane  $\beta$ -glucuronidase.

Mit der erfindungsgemäßen Verwendung des oder der Immunsuppressiva wird insbesondere eine Inhibition der zellulären Immunantwort gegen die transgenen Zellen erreicht. Die Erfindung ist ferner gekennzeichnet, daß etwa 15 Tage nach Absetzen des immunsuppressiv wirkenden Arzneimittels oder der Arzneimittelkombination in den behandelten Säugtieren noch mehr als das 1,5-fache, bevorzugt mehr als doppelte, ganz besonders bevorzugt mehr als das 5fache an transgenem Expressionsprodukt erzeugt werden kann wie in Säugtieren einer nicht immunsupremierten Kontrollgruppe. Der Nachweis des exprimierten transgenen Produktes muß nicht am 15. Tag erfolgen; es ist auch möglich Messungen vor oder nach diesem Zeitpunkt durchzuführen. Entscheidend ist, daß nicht schon wenige Tage, z.B. 10 oder 20 Tage, nach Absetzen der immunsuppressiven Behandlung, das transgene Expressionsprodukt nur in gleicher oder geringerer Menge hergestellt wird wie in nicht-immunsupremierten Organismen einer Kontrollgruppe.

Die erfindungsgemäße Verwendung umfaßt des weiteren eine Verabreichung des Arzneimittels oder der Arzneimittelkombination vor, während und/oder nach der

Applikation der in vitro erzeugten transgenen Zellen bzw. deren Erzeugung in vivo. Ebenso umfaßt wird die erfindungsgemäße Verwendung zur Unterstützung einer transgene Zellen erzeugenden gentherapeutischen Behandlung.

Bei der zu unterstützenden gentherapeutischen Behandlung wird in vitro oder in vivo genetisches Material in Form von einer oder mehreren Nukleinsäureketten in Zellen eingeschleust. Dies erfolgt beispielsweise mit Hilfe viraler Vektoren, z. B. Adenoviren, Retroviren oder Herpesviren, oder anderen Methoden, z. B. über Transfektion, durch direkte Injektion, per "Gene gun", oder mit Hilfe von Liposomen, Virosomen oder Rezeptor-vermittelten Transportsystemen.

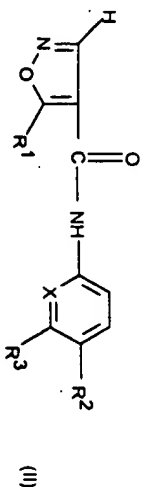
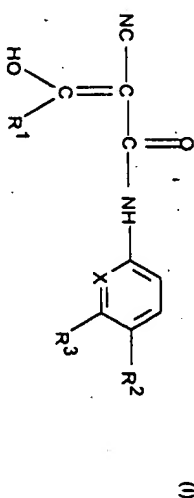
Mit der zu unterstützenden Gentherapie können Erkrankungen behandelt werden, bei denen ein Protein oder Peptid nicht, unzureichend oder nur fehlerhaft im Körper des Säugtiers hergestellt wird, aber sie findet auch Anwendung, um einen Impfschutz gegen diverse Krankheitsreize oder gegen entartete körpereigene Zellen zu erzeugen sowie für die Herstellung nicht-natürlicher Proteine oder Peptide in Körperzellen, die z. B. Aktivitäten von Enzym- oder Signalkaskaden fördernd oder inhibierend beeinflussen oder für die Herstellung von Enzymen, die spezifische Produktionsaktivieren. So kann die zu unterstützende Gentherapie eingesetzt werden zur Behandlung von angeborenen Erkrankungen wie der zystischen Fibrose, der Hämophilie, der familiären Hypercholesterinämie, der Sichelzellanämie, der Phenylketonurie, von Stoffwechselstörungen, z. B. Diabetes, von Entzündungen, von Nerven- und Hirnerkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder Jakob-Kreutzfeld-Syndrom, von rheumatischen Erkrankungen, Osteoarthritis, Osteoporose oder Arthrose, von Krebserkrankungen, von Infektionserkrankungen, z. B. AIDS oder Hepatitis oder von Hormon- und Wachstumsstörungen. Die Erzeugung eines Impfschutzes gegen Krankheitsreize wie Viren, Bakterien, Pilze, ein- und mehrzellige Parasiten sowie gegen entartete körpereigene Zellen, z. B. Tumorzellen ist ein weiterer zu unterstützender gentherapeutischer Einsatzbereich.

Die Erfindung beinhaltet weiterhin ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels oder einer Arzneimittelkombination, um die Toleranz eines Säugtiers gegenüber transgenen Zellen zu erhöhen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein

5 Immunsuppressivum oder eine Kombination mehrerer Immunsuppressiva mit einem physiologisch annehmbaren Träger und weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt. Beispielsweise kann Leflunomid und/oder dessen physiologisch verträgliche und pharmakologisch wirksame Salze, Derivate, Isomere sowie Metabolite als Immunsuppressivum - allein oder in Kombination auch mit anderen Immunsuppressiva verwendet werden.

10 Das erfindungsgemäße Arzneimittel oder die erfindungsgemäße Arzneimittelkombination kann beispielsweise oral, intravenös, subkutan, intraperitoneal, perkutan, kutan, topisch, inhalativ, intramuskulär, intrathekal, intraokulär, okulär, buccal, nasal oder rektal, bevorzugt intravenös oder oral verabreicht werden.

15 Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft die erfindungsgemäße Verwendung einer Verbindung der Formel (I) oder (II)



25 und/oder eine gegebenenfalls stereoisomere Form der Verbindung der Formel I oder II und/oder ein physiologisch verträgliches Salz der Verbindung der Formel I, wobei

- 30 R<sup>1</sup> für a) (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl,  
b) (C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)-Cycloalkyl,  
c) (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl oder  
d) (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl, steht,

R<sup>2</sup> für a)

-CF<sub>3</sub>.

b) -O-CF<sub>3</sub>.

c) -S-CF<sub>3</sub>.

d) -OH.

e) -NO<sub>2</sub>.

f) Halogen.

g) Benzyl.

h) Phenyl.

i) -O-Phenyl.

k) -CN oder

l) -O-Phenyl, ein oder mehrfach substituiert mit

1) (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl.

2) Halogen.

3) -O-CF<sub>3</sub> oder

4) -O-CH<sub>3</sub> steht.

R<sup>3</sup> für a)

b) Halogen, oder

c) ein Wasserstoffatom steht, und

X für a) eine -CH-Gruppe oder

b) ein Stickstoffatom, steht

zur Herstellung des Arzneimittels oder der Arzneimittelkombination allein oder in Kombination auch mit anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen, insbesondere anderen Immunsuppressiva.

5 Bevorzugt ist eine Verbindung der Formel I und/oder II und/oder eine gegebenenfalls stereoisomere Form der Verbindung der Formel I oder II und/oder ein Salz der Verbindung der Formel I, wobei

R<sup>1</sup> für a) Methyl.

b) Cyclopropyl oder

c) (C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)-Alkyl steht.

R<sup>2</sup> für -CF<sub>3</sub> oder -CN steht.

R<sup>3</sup> für Wasserstoffatom oder Methyl steht, und

X für eine -CH- Gruppe steht.

Insbesondere bevorzugt werden 5-Methyl-isoxazol-4-carbonsäure-4-(trifluormethyl)-anilid, N-(4-Trifluormethylphenyl)-2-cyan-3-hydroxy-crotonsäureamid, 2-Cyano-3-cyclopropyl-3-hydroxy-acrylsäure-(4-cyanophenyl)-amid oder N-(4-Trifluormethylphenyl)-2-cyan-3-hydroxy-hept-2-en-6-in-carbonsäureamid eingesetzt.

10 Diese Verbindungen der Formeln I und/oder II oder deren physiologisch verträgliche und pharmakologisch wirksame Salze oder Derivate werden beispielsweise in einer Dosis von 0,1 bis 100 mg/kg, bevorzugt 0,1 bis 50 mg/kg, ganz besonders bevorzugt 0,5 bis 20 mg/kg, verabreicht.

15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Identifizieren eines geeigneten Immunsuppressivums oder einer Kombination mehrerer Immunsuppressiva, die die Toleranz eines Säugtiers gegenüber transgenen Zellen erhöhen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Menge an transgenem Expressionsprodukt nach 15, 30, 50 oder mehr Tagen nach Absetzen der immunsuppressiven Behandlung einmal oder mehrmals gemessen wird, in Bezug zur Menge an transgenem Expressionsprodukt, die von nicht immunsupprimierten Säugtieren einer entsprechenden Kontrollgruppe erzeugt wurde, in Beziehung gesetzt wird und als Auswahlkriterium ein Mengenfaktor (= Menge an von der immunsupprimierten Tiergruppe erzeugten transgenen Expressionsprodukt / Menge an von der nichtimmunsupprimierten Kontrolltiergruppe erzeugten transgenen Expressionsprodukt; jeweils bezogen auf einen vergleichbaren zeitlichen Bezugspunkt) beispielsweise von mehr als 1,5, oder größer als 2, bevorzugt größer als 5, ganz besonders bevorzugt größer als 10, eingesetzt wird. Der Nachweis des exprimierten transgenen Produktes muß nicht erst ab dem 20. Tag nach Absetzen der immunsuppressiven Behandlung erfolgen. Eine kontinuierliche Verfolgung der Expressionsrate des transgenen Produktes, z.B. ab dem Zeitpunkt der Erzeugung der transgenen Zellen, ab dem 1. Tag nach Absetzen der immunsuppressiven Behandlung oder ab dem 10. Tag nach Absetzen der immunsuppressiven Behandlung, sind im Sinne der Erfindung durchaus möglich.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung. Sie sind nicht als Einschränkung irgendeiner Art zu verstehen.

#### Beispiel 1:

Cyclosporin A (50 - 100 mg/kg/Tag) und DSG (10 mg/kg/Tag) wurde den Mäusen über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Gabe eines rekombinanten Adenovirus (Reporter gen  $\beta$ -Galactosidase; Bell et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 (1994), Seiten 8802-8806) verabreicht.

Die Kontrollgruppe erreicht ein Maximum der Reporterexpression in der Leber am 6. Tag, danach wird die Expression durch die Aktivität zytotoxischer T-Zellen kontinuierlich abgebaut und erreicht nach etwa 21 Tagen Ausgangsniveau.

Sowohl in der Cyclosporin A-, als auch in der DSG-Gruppe hält die Expression über den Behandlungszeitraum von 21 Tagen unvermindert an.

In der Kontrollgruppe konnte bereits 5 Tage nach Vektorgabe die Bildung von Antikörpern nachgewiesen werden. In der Cyclosporin A- und der DSG-Gruppe wurde Antikörperproduktion in den oben angegebenen Dosen vollständig aufgehoben.

Nach Absetzen der Immunsuppressiva fiel die Reporterexpression in der Cyclosporin A-Gruppe über einen Zeitraum von 21 Tagen (42 Tage nach Vektorgabe) auf Ausgangsniveau während in der DSG-Gruppe noch eine massive Genexpression nachweisbar war.

In etwa 50 % der Tiere die nur für 5 Tage nach Vektorgabe mit DSG behandelt wurden konnte am 42. Tag nach Vektorgabe noch etwa 10 % der Maximalexpression gemessen werden. Offensichtlich hemmt DSG besonders die Frühphase der T-Zellstimulation sehr effektiv.

#### Beispiel 2

Am Tag 0 wurde allen Mäusen eine Dosis von  $1 \times 10^{10}$  Adenoviren über die Schwanzvene appliziert. Die rekombinanten Adenoviren tragen als serumständiges Reporter gen das Gen für humanes alpha 1-Antitrypsin. Dieses Gen hat sich als ein praktikabler Reporter erwiesen, da es in der Maus nicht antigen wirkt, aber dennoch mit einem spezifischen Antikörper vom murinen alpha 1-Antitrypsin unterschieden werden kann. Die Halbwertszeit der Antiprotease ist etwa 3 - 4 Tage, so daß der Serumspiegel recht gut die aktuelle Syntheseleistung der Leber spiegelt.

10 Das Gesamtkollektiv wurde in fünf Gruppen mit jeweils 4 Tieren unterteilt, die wie folgt behandelt wurden:

1. Gruppe: Kontrollgruppe - keine immunsuppressive Behandlung, Applikation von Kochsalzlösung i.p. für die Dauer von 5 Tagen nach Virusgabe.

15 2. Gruppe: FK 506 Gruppe - Applikation von 1 mg/kg/Tag FK 506 i.p. beginnend 1 Tag vor Virusgabe und danach für eine Dauer von 5 Tagen.

20 3. Gruppe: Cyclosporin A-Gruppe - Applikation von 20 mg/kg/Tag i.p. beginnend 1 Tag vor Virusgabe und danach für eine Dauer von 5 Tagen.

4. Gruppe: DSG-Gruppe - Applikation von 10 mg/kg/Tag i.p. beginnend 1 Tag vor Virusgabe und danach für die Dauer von 5 Tagen.

25 5. Gruppe: DSG ++ - Gruppe - Applikation von 10 mg/kg/Tag i.p. beginnend 1 Tag vor Virusgabe und danach für die Dauer von fünf Tagen täglich und anschließend zweimal wöchentlich für die Dauer von 150 Tagen.

30 NMRI-Mäuse wurden verwendet, da diese Mäuse durch ihre genetische Heterogenität ein immunologisches Reaktionsmuster entwickeln, das dem einer humanen Population näher kommt als reine Inzuchtstämme, der Preis ist eine erhöhte Variabilität in der Immunologischen Reaktionsfähigkeit. Trotzdem bilden die einzelnen Gruppen signifikante Reaktionsmuster aus.

Tabelle 1 zeigt die Mittelwerte des Serumsiegels von humanen  $\alpha_1$ -Antitrypsin.

Tabelle 1

Tage	FK 506	Cyclosporin A	Kontrolle	DSG	DSG++
5	1725000	1518750	1453750	2775000	2775000
10	1278750	660000	616250	1560000	677500
20	376250	264875	1055000	1826250	1178750
30	17475	77787	117812	1001250	1082500
60	4258	23875	37625	213500	297500
100	313	1876	12475	51750	68750
150	1,5	8	2425	13125	17125
200	1,5	1,5	1797	10625	14350

Bereits eine 5-tägige Behandlung mit DSG führt zu einer deutlichen Erhöhung und Verlängerung der Antitrypsinexpression. Der Mengenfaktor beträgt 15 Tage nach Absetzen von DSG etwa 1,8. Die kontinuierliche Behandlung (2 x wöchentlich) vermag diesen Effekt nicht mehr dramatisch zu steigern. Durch die kontinuierliche DSG-Behandlung wird die Expression nur geringfügig über die transiente Gabe gesteigert, aber der Antikörperload gegen virale Proteine wird etwa um 90 % nach 150 Tagen reduziert (siehe Tabelle 2). Bereits die transiente Gabe von DSG reduziert im Vergleich zur Kontrolle die Antikörperantwort um mehr als 60 % bei gleichzeitig deutlich positivem Effekt auf die Expression.

Tabelle 2: Mittlerer Antikörper-Titer

5

Tage	Kontrolle	DSG	DSG++	FK 506	Cyclosporin A
30	54188	26310	13005	65536	47923
100	59707	31029	11251	43332	32994
150	68555	25149	7335	25149	28568
200	45641	20586	9669	17710	26021

10

Interessant ist, daß die kurzfristige Gabe von FK 506 und Cyclosporin A kontraproduktiv im Sinne einer Langzeitexpression ist. Möglicherweise reagiert das Immunsystem mit einer überschießenden Aktivität nach Absetzen der Immunsuppressiva und eliminiert die transgenen Hepatozyten schneller als in der Kontrollgruppe.

15

# Patentansprüche:

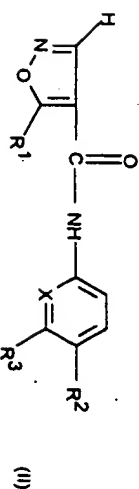
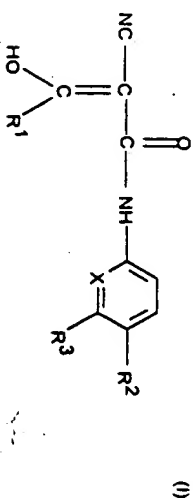
1. Verwendung eines Immunsuppressivums oder einer Kombination mehrerer Immunsuppressiva zur Herstellung eines Arzneimittels oder einer Arzneimittelkombination zur Erhöhung der Toleranz eines Säuglers, insbesondere des Menschen, gegenüber transgenen Zellen, wobei die Verbindungen Cyclosporin A und FK 506 alleine eingesetzt ausgenommen sind.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei primär die zelluläre Immunreaktion gegen die transgenen Zellen inhibiert wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei 15 Tage nach Absetzen dieses Arzneimittels oder dieser Arzneimittelkombination in den behandelten Säugelieren mehr als das 1,5 fache, bevorzugt mehr als doppelte, ganz besonders bevorzugt mehr als das 5fache an transgenem Expressionsprodukt erzeugt wird wie in Säugelieren einer nicht immunsupprimierten Kontrollgruppe.
4. Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel oder die Arzneimittelkombination vor, während und/oder nach der Applikation der in vitro erzeugten transgenen Zellen oder der in vivo-Erzeugung der transgenen Zellen verabreicht wird.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die transgenen Zellen im Rahmen einer gentherapeutischen Behandlung erzeugt werden.
6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Gentherapie eingesetzt wird zur Behandlung aller Erkrankungen, bei denen ein Protein oder Peptid nicht, unzureichend oder nur fehlerhaft im Körper des Säuglers hergestellt wird.
7. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die

Gentherapie eingesetzt wird zur Behandlung von angeborenen Erkrankungen wie der zystischen Fibrose, der familiären Hypercholesterinämie, der Hämophilie, der Sichelzellanämie, von Nerven- und Hirnerkrankungen wie Parkinson-, Alzheimer- oder Jakob-Kreutzfeld-Syndrom; von rheumatischen Erkrankungen, Osteoarthritis, Osteoporose oder Arthrose, der Phenylketonurie; von Stoffwechselerkrankungen, z.B. Diabetes; von Entzündungen; von Krebserkrankungen, vor Infektionserkrankungen, z.B. AIDS oder Hepatitis; von Hormon- und Wachstumsstörungen.

Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Gentherapie eingesetzt wird, um einen Impfschutz zu erzeugen gegen Krankheitserreger wie z.B. Viren, Bakterien, Pilze, ein- und mehrzellige Parasiten sowie gegen entartete körpereigene Zellen, z.B. Tumorzellen.

Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel oder die Arzneimittelkombination oral, intravenös, subkutan, intraperitoneal, perkutan, kutan, topisch, inhalativ, intramuskulär, intrathekal, intraokulär, okulär, buccal, nasal oder rektal, bevorzugt intravenös oder oral verabreicht wird.

Verwendung nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß eine Verbindung der Formel (I) oder (II)





und/oder eine gegebenenfalls stereoisomere Form der Verbindung der Formel I oder II und/oder ein physiologisch verträgliches Salz der Verbindung der Formel I, wobei

- R<sup>1</sup> für a) (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl,  
 b) (C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)-Cycloalkyl,  
 c) (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl oder  
 d) (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkinyl, steht,  
 R<sup>2</sup> für a) -CF<sub>3</sub>,  
 b) -O-CF<sub>3</sub>,

- c) -S-CF<sub>3</sub>,  
 c) -OH,  
 a) -NO<sub>2</sub>,  
 f) Halogen,  
 g) Benzyl,  
 h) Phenyl,  
 i) -O-Phenyl,  
 k) -CN oder  
 l) -O-Phenyl, ein oder mehrfach substituiert mit

- 1) (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl,  
 2) Halogen,  
 3) -O-CF<sub>3</sub> oder  
 4) -O-CH<sub>3</sub>, steht,

R<sup>3</sup> für a) (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl,

b) Halogen, oder

c) ein Wasserstoffatom steht, und

X für a) eine -CH-Gruppe oder  
 b) ein Stickstoffatom, steht

zur Herstellung des Arzneimittels oder der Arzneimittelkombination allein oder in Kombination auch mit anderen pharmakologisch wirksamen Substanzen, insbesondere anderen Immunsuppressiva.

Verbindung der Formel I oder II und/oder ein Salz der Verbindung der Formel I, wobei

- R<sup>1</sup> für a) Methyl,  
 b) Cyclopropyl oder  
 c) (C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)-Alkinyl steht,  
 -R<sup>2</sup> für -CF<sub>3</sub> oder -CN steht,  
 R<sup>3</sup> für Wasserstoffatom oder Methyl steht, und  
 X für eine -CH-Gruppe steht, eingesetzt wird.

Verwendung gemäß Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß 5-Methyl-isoaxazol-4-carbonsäure-4-(trifluormethyl)-anilid, N-(4-Trifluormethyl-phenyl)-2-cyan-3-hydroxy-crotonsäureamid, 2-Cyan-3-cyclopropyl-3-hydroxy-acrylsäure-(4-cyanophenyl)-amid oder N-(4-Trifluormethyl-phenyl)-2-cyan-3-hydroxy-hept-2-en-6-in-carbonsäureamid eingesetzt wird.

Verfahren zum Identifizieren eines geeigneten Immunsuppressivums oder einer Kombination mehrerer Immunsuppressiva, die die Toleranz eines Säugtiers gegenüber transgenen Zellen erhöhen, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge an in vivo erzeugtem transgenen Expressionsprodukt nach Absetzen des Immunsuppressivums gemessen wird, in Bezug zur Menge an transgenem Expressionsprodukt, die von nicht Immunsupprimierten Säugtieren einer entsprechenden Kontrollgruppe erzeugt wurde, in Beziehung gesetzt wird und als Auswahlkriterium ein Mengenfaktor von mehr als 1 eingesetzt wird.

Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß als zeitlicher Bezugspunkt für die Mengenfaktorbestimmung ein Tag nach dem 10., bevorzugt nach dem 20., besonders bevorzugt nach dem 30. Tag, ganz besonders bevorzugt nach dem 50. Tag nach Absetzen des Immunsuppressivums herangezogen wird.

Verwendung gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Formel I und/oder II und/oder eine gegebenenfalls stereoisomere Form der

Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Mengenfaktor größer als 1,5, bevorzugt größer als 2, besonders bevorzugt